

UNIwersYTET w BIAŁYMSTOKU
Wydział Biologiczno-Chemiczny
INSTYTUT CHEMII



dr hab. Agnieszka Z. Wilczewska, prof. UwB
15-245 Białystok, ul. Ciołkowskiego 1K, ☎ (85) 738 80 37, fax: 738 80 99, e-mail: agawilcz@uwb.edu.pl

Białystok, 08.08.2019 r

Szanowni Państwo,

Przesyłam recenzję rozprawy doktorskiej mgr. Rafała Bielasa pt. „Badania nad syntezą kopolimerów liniowych i szczepionych zawierających jednostki pochodnych choliny z wybranymi anionami o działaniu terapeutycznym jako nowych układów biofunkcyjnych”.

Z poważaniem,

Agnieszka Z. Wilczewska



Białystok, 08.08.2019 r

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Rafała Bielasa

pt. „Badania nad syntezą kopolimerów liniowych i szczepionych zawierających jednostki pochodnych choliny z wybranymi anionami o działaniu terapeutycznym jako nowych układów biofunkcyjnych”

Praca doktorska Pana mgr Rafała Bielasa została wykonana w Katedrze Fizykochemii i Technologii Polimerów Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Doroty Neugebauer. Dorobek badawczy Doktoranta w zakresie przedstawionej pracy stanowią trzy artykuły naukowe, wszystkie opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i bardzo dobrym współczynniku oddziaływania (IF 6,970, 4,561, 3,069). Dodatkowo dwie prace zostały wysłane do druku. Doktorant jest również współautorem dodatkowych 8 publikacji z listy JRC oraz 14 wystąpień konferencyjnych (postery i komunikaty) prezentowanych na konferencjach i seminariach o zasięgu ogólnopolskim i międzynarodowym. Był kierownikiem projektu Preludium oraz wykonawcą w grantie Opus promotora.

Tematyka pracy dotyczy projektowania, syntezy nowoczesnych systemów dostarczania leków, ich modyfikacji oraz badania interakcji z substancjami charakteryzującymi się aktywnością biologiczną. Wysoko wyspecjalizowane nośniki skupiają obecnie uwagę ze względu na zakres potencjalnych aplikacji. Dotyczy to w szczególności terapii i diagnostyki medycznej. Celem pracy była synteza liniowych oraz szczepionych kopolimerów choliny i metakrylanu metylu. Do otrzymywania polimerów wykorzystano nowoczesną metodę polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu (ATRP). Szczególną rolę w polimeryzacji monomerów jonowych odgrywa przeciwjon, dlatego też wymiana anionu zarówno w monomerach jak i zsyntezowanych polimerach stanowiła jeden z ważniejszych celów recenzowanej rozprawy. Kolejnym zagadnieniem było zbadanie możliwości wykorzystania otrzymanych układów do immobilizowania substancji aktywnych, którymi były zarówno substancje jonowe stanowiące przeciwjon jak i związki niepolarne.

Zagadnienia podjęte w rozprawie doktorskiej mgr Rafała Bielasa bardzo dobrze wpisują się w nowoczesne trendy badawcze: poszukiwania nośników leków, a w szczególności badania natury i sposobu ich działania.

Dostarczona do recenzji praca obejmuje 142 strony maszynopisu, w tym „Wprowadzenie” (2 strony), „Cel i zakres pracy” (2 strony), „Część literaturową” (35 stron), „Część eksperymentalną” (14 stron),

„Omówienie wyników” (56 stron) oraz „Podsumowanie i wnioski” (4 strony). W skład pracy wchodzi również: „Streszczenie” (1 strona), „Wykaz skrótów” (2 strony), „Spis rysunków” (4 strony, 62 pozycji), „Spis tabel” (1 strona, 17 pozycji). W końcowej części pracy znajduje się spis piśmiennictwa (12 stron, 202 pozycje) oraz „Wykaz dorobku naukowego Doktoranta” (4 strony).

Po krótkim wprowadzeniu dotyczącym systemów kontrolowanego dostarczania leków oraz zastosowania pochodnych choliny do tworzenia polimerów typu poli(cieczy jonowych) mgr Bielas przedstawił cel i zakres pracy. Po ogólnym celu pracy w kolejnych akapitach Doktorant omówił założenia swoich badań oraz wypunktował zbadane parametry.

„Część literaturową” autor poświęcił polielektrolitom, które stanowiły przedmiot rozprawy. Podzielił ją na cztery podrozdziały omawiając: polielektrolity, metody otrzymywania, budowę, ich właściwości biologiczne i biomedyczne oraz podał przykłady zastosowań. Najwięcej uwagi zwrócił na sole imidazoliowe ich budowę i zastosowania. W rozdziale metody otrzymywania omówione zostały jedynie rodnikowe metody polimeryzacji monomerów winylowych przez odwracalną dezaktywację (RDRP) ze szczególnym uwzględnieniem stosowanej w pracy polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu. Co było uzasadnione przedmiotem rozprawy. W części topologia polielektrolitów autor przedstawił budowę, sposoby otrzymywania polimerów szczepionych oraz samoorganizację polimerów w roztworach: w tym formowanie układów micelarnych. W ostatnich podrozdziałach, tej części pracy, omówił on właściwości jakimi powinien charakteryzować się nośnik stosowany do kontrolowanego dostarczania leków. W tym rozdziale Pan mgr Bielas wskazał również przykłady literaturowe polimerów zawierających akrylowe pochodne choliny, będące przedmiotem przedstawionych w pracy badań.

Część literaturowa stanowi cenne wprowadzenie do tematyki badań, pozwalając na uzasadnienie celu oraz określenie problemu badawczego.

W części eksperymentalnej Doktorant przedstawił stosowane materiały: odczynniki, rozpuszczalniki, substancje biologicznie czynne. Omówił on procedury wymiany anionów zarówno w akrylanie choliny jak i w wyniku post-modyfikacji uzyskanych polimerów. Opisał metodykę otrzymywania kopolimerów liniowych oraz szczepionych, a także sposób micelizacji, enkapsulacji i badania uwalniania substancji aktywnych. W tej części przedstawione również zostały techniki fizykochemiczne stosowane podczas wykonywania pracy.

Pytania i uwagi do tej części pracy: W jaki sposób przygotowano próbki do analiz, w szczególności HPLC? Czy roztwory były zatężane, substancje badane ekstrahowane? Czy były to roztwory wodne po dializie? W rozdziale tym zabrakło metodyki badań ilościowych metodą NMR, które stanowiły podstawę wyznaczania stopnia konwersji monomerów oraz % wymiany anionów. W dalszej części autor wskazuje na ilościowe badania ¹³C-NMR (str. 76). Proszę o komentarz na temat metodyki tych pomiarów.

Najbardziej obszerną częścią pracy jest rozdział „Omówienie wyników”. Podzielony on został na sześć podrozdziałów. Na początku autor omawia warunki przygotowania monomerów choliny z różnymi przeciwjonami. W dalszych podrozdziałach przedstawia syntezę kopolimerów liniowych akrylanowych pochodnych choliny z jonami chlorkowymi, salicynowymi oraz imidku bis(trifluorometanosulfonowego). Pan mgr Bienias napisał „warunki polimeryzacji dobrano tak aby uniknąć wytrącania polimeru podczas polimeryzacji”. Brak jednak pełniejszego spojrzenia na inne parametry polimeryzacji i zmienne. Podanie założeń, warunków wyjściowych (stałych) polimeryzacji ułatwiło by śledzenie toku rozumowania

Doktoranta. Trudno jest porównać konwersję monomerów, jeżeli zmieniało się czas i temperaturę polimeryzacji, ilość rozpuszczalnika oraz stosunek inicjatora do monomerów. Zbyt dużo zmiennych. Czynnikiem determinującym była zapewne lepkość roztworu, ale ją można kontrolować również ilością rozpuszczalnika. Dlaczego ograniczano ilość rozpuszczalnika, jeżeli to powodowało wzrost lepkości i miało wpływ na % konwersji, str. 66. W tym przypadku metakrylan metylu polimeryzuje szybciej niż ChMA/NTf, a przy tak krótkim czasie polimeryzacji udział frakcji jonowej jest nieznaczny. Wynik tej reakcji pokazuje, że wydłużenie czasu polimeryzacji mogłoby doprowadzić do powstania kopolimerów gradientowych, o właściwościach zbliżonych do kopolimerów blokowych. Dalej, dlaczego były obserwowane tak duże różnice w wyznaczonych średnich ciężarach cząsteczkowych metodą NMR oraz GPC? Czasami jest to rząd wielkości. Jakie są teoretyczne ciężary cząsteczkowe wyznaczone z uwzględnieniem % konwersji? Czy podczas wykonywania analiz GPC wzięto pod uwagę dn/dc polistyrenu, czy poli(metakrylanu metylu) lub poli(metakrylanu choliny)? Czy podczas filtrowania, o ile takie było wykonywane przed analizami nie nastąpiło frakcjonowanie z zatrzymaniem na filtrze polimerów o większym ciężarze cząsteczkowym? Proszę o komentarz. Pomimo tych drobnych uwag dotyczących raczej sposobu przedstawienia wyników a nie samych badań uważam, że badania będące przedmiotem rozprawy są bardzo interesujące.

Doktorant ustalił zależności pomiędzy budową polimerów liniowych i szczepionych, a ich cechami fizykochemicznymi. Polimery zostały scharakteryzowane przez szereg technik, takich jak: NMR, FT-IR, DLS, potencjał Zeta, GPC, DSC, UV-Vis, spektroskopia fluorescencyjna. Wybrane układy poddano analizom TEM.

Pan mgr Bienias zbadał efektywność wymiany anionów w akrylanie choliny, przedyskutował zależności pomiędzy ich budową a trwałością tworzących się kompleksów. Stwierdził, że rodzaj anionu wpływa na przebieg kopolimeryzacji (szybkość, stopień konwersji), jak również właściwości fizykochemiczne (rozpuszczalność w wodzie, właściwości termiczne). Homopolimeryzacja metakrylanu chlorku choliny w środowisku metanolu prowadziła do częściowej transestryfikacji. Prawdopodobnie też wpłynęło to na skład kopolimerów, które zawierały większą frakcję akrylanu metylu niż wstępnie zakładano. Proszę o wyjaśnienie jaki sposób badano % przereagowania? Czy podobną reakcję obserwowano w przypadku polimeryzacji salicynianów, których polimeryzacje również były prowadzone w mieszaninie wody i metanolu? W przypadku polimeryzacji monomeru choliny z anionem imidkowym reakcje prowadzone były w tetrahydrofuranie, a uzyskane polimery były nierozpuszczalne w wodzie. Doktorant porównał możliwość wymiany jonowej na wcześniej uzyskanych kopolimerach liniowych. Zbadał on i porównał właściwości fizykochemiczne (temperatury zeszklenia) uzyskanych układów, stwierdzając, że wymiana nie zachodziła całkowicie. Uważam, że trudno w tym przypadku było oczekiwać podobnych wyników jak w przypadku polimeryzacji monomeru zawierającego aniony imidkowe. Polimeryzacje były prowadzone w różnych warunkach (czas polimeryzacji, rozpuszczalnik) a takie bezpośrednie porównanie byłoby możliwe jedynie w przypadku jednakowych rozmieszczeń zarówno jednostek powtarzalnych w polimerze, jak i takiego samego % konwersji monomerów. Badania te dały jednak podstawę do modyfikacji polimerów w celu wyznaczenia ciężarów cząsteczkowych metodą chromatografii żelowej (GPC), gdyż uzyskane kopolimery były rozpuszczalne w rozpuszczalniku niepolarnym jakim był DMF.

Znaczące różnice w polimeryzacji w porównaniu do otrzymywania kopolimerów blokowych Pan mgr Bienias zaobserwował w przypadku polimerów szczepionych. Szczepienie jonowych łańcuchów

polimerowych wykonywano na zmodyfikowanych kopolimerach poli(metakrylanu metylu-co-metakrylanu 2-hydroksy etylu) o różnych długościach łańcucha HEMA. Modyfikacja dotyczyła estryfikacji grup hydroksylowych HEMA, w wyniku czego uzyskano makroinicjatory zawierające trzeciorzędowe bromki alkilowe. W porównaniu do syntezy kopolimerów liniowych konieczne było zastosowanie niższej temperatury reakcji oraz mniej reaktywnego aktywatora (zamiast bromku zastosowano chlorek miedzi(II)). Zbadano również wpływ budowy kopolimerów na samoorganizację w roztworach wodnych i zdolność do tworzenia miceli. Wyznaczono średnicę hydrodynamiczną zsyntezowanych polimerów metodą DLS, krytyczne stężenie micelizacji, potencjał Zeta oraz temperatury zeszklenia. W przypadku kopolimeru P(ChMA/Sal-MMA) i kopolimeru szczepionego przedstawiono również zdjęcia wykonane za pomocą Transmisyjnego Mikroskopu Elektronowego. Ciekawe są spostrzeżenia dotyczące budowy przestrzennej tworzących się w roztworach wodnych polimerowych struktur. Czy były wykonywane również zdjęcia dla układów o podobnej długości łańcucha z innymi przeciwjonami, np. L7? Było by to interesujące, zwłaszcza, że średnice hydrodynamiczne tych układów są znacząco różne: 10 nm (L1 – bardzo małe struktury) i 201 nm (L17). To pytanie także dotyczy kopolimerów szczepionych. Czy w przypadku innych kopolimerów obserwowano struktury typu core-shell?

Ostatnia część badań własnych dotyczy zastosowania otrzymanych kopolimerów do enkapsulacji substancji aktywnych. Substancjami aktywnymi wybranymi do badań były: związki jonowe stanowiące przeciwjony kopolimerów cholinowych: salicyniany i sulfacetamidy oraz substancje o charakterze niejonowym: erytromycyna, indometacyna oraz kwercetyna. Doktorant badał kinetykę uwalniania salicynianowych i sulfacetamidowych w roztworze buforu fosforanowego o pH = 7,4. Stwierdził on, że jonowe substancje czynne są uwalniane według kinetyki pierwszego rzędu, z największym „wyrzutem” substancji aktywnej w pierwszych godzinach prowadzenia dializy. Pan mgr Bienias wykonał też próby enkapsulacji związków niejonowych w struktury polimerowe. Najlepsze wyniki uzyskując dla erytromycyny w kopolimerze zawierającym jony salicylanowe. W przypadku kopolimerów sulfacetamidowych próby enkapsulacji leków hydrofobowych nie powiodły się. Uwalnianie leków stanowiło niemały problem, kopolimery choliny z jonem chlorkowym nie były efektywne. Wyjątek stanowił układ erytromycyna: kopolimer choliny z jonem salicylanowym. Przeprowadzone zostały testy toksyczności, na podstawie których autor stwierdził, iż uzyskane materiały są biokompatybilne. Obiecujące okazały się badania ekspresji genów oraz działanie przeciwwzapalne lub przeciwbakteryjne wybranych koniugatów lek-polimer.

Podsumowując, przedstawione badania wskazują, że aktywność biologiczna układów lek-polimerowy nośnik zależy przede wszystkim od budowy nośnika. Pan mgr Bienias przedstawił kompleksowe badania pozwalające na zbadanie wpływu jonu kompleksującego (chlorki, slicyniany, imidki, sulfacetamidy) na właściwości fizykochemiczne, efektywność enkapsulacji i uwalniania substancji biologicznie czynnych w warunkach fizjologicznych. Różnice dotyczyły również kopolimerów liniowych i szczepionych. Doktorant udowodnił możliwość modyfikacji kopolimerów przez wymianę jonową.

Do tekstu rozprawy zakradła się pewna liczba nieścisłości i błędów, z których kilka z obowiązku recenzenta wymieniam. Na przykład, sformułowania: „anion farmaceutyczny, str. 10”, „kopolimer schizofreniczny”, str. 13, 14, ” – mają charakter żargonu laboratoryjnego. Str. 13 opis do rysunku 2 - niefortunne użycie „ugrupowania zasadowe”, gdyż w warunkach kwasowych są to sprotonowane zasady

i zgodnie z teorią kwasów i zasad Lewisa są to kwasy. „Zjonizowane ugrupowania kwasowe” są zasadami. Takie układy można było nazwać „formą kationową i anionową”. Str. 8 DDS to – system kontrolowanego dostarczania, a nie „uwalniania” leków, chociaż oba te procesy występują przy zastosowaniach tego typu układów. Str. 7 PEG – „glikol polietylenowy” – prawidłowo powinno być poli(glikol etylenowy); Str. 7 i 14, 35 poli(N-izopropylakryloamid) – funkcjonująca nazwa takiego amidu to akrylamid bez o. Rysunek 1, str. 13 kation wodorkowy i anion hydroksylowy w pierwszej reakcji powinny być zamienione miejscami. Str. 13, 42 PCI – zgodnie ze wykazem skrótów powinno być PCL – polikaprolakton. Cl w całej pracy autor zarezerwował dla jonu chlorkowego. Str. 48 nazwa imidku jest „imidek bis(trimetanosulfonowy) litu” powinno być „imidek bis(trifluorometanosulfonowy) litu”. Sformułowania i skróty myślowe: „związany fizycznie z tyrozyną” i „poszukuje się ... zastosowań biomedycznych z ich wykorzystaniem” na str. 19; „Nośniki ulegają skurczeniu w środowisku wodnym” str. 42; „... a tym samym zwierające go makrocząstki” str. 62; „nie daje na nich sygnałów” str. 75, „szkielet hydrofobowy skurczył się tworząc rdzeń” str. 83. Str. 42 autor zastosował skróty nazw polimerów w połączeniu z pełnymi nazwami, np. PEG-*b*-(poli(eter allilowo-glicydowy) co powinno być ujednolicone. Str. 44 powinno być polietylenoiminy, bez nawiasów, które rezerwuje się dla nazw dwuczłonowych i zawierających symbole oraz znaczniki numeryczne. Str. 64, tabela 4 czy wartości % mol MMA do ChMA/Cl są prawidłowe dla polimerów L1-L7? Wartości te powinny być dwucyfrowe? Str. 105, rys. 55. brak podpisów A, B, C ... na rysunku.

Zakres wykonanej, przez Doktoranta, pracy badawczej, tj. przygotowanie różnych układów polimerowych, badania fizykochemiczne oraz biologiczne, wymagał interdyscyplinarnej wiedzy teoretycznej i umiejętności preparatywnych. Zastosowanie różnych warunków prowadzenia polimeryzacji oraz zaproponowane modyfikacje polimerów jonowych pozwoliły na określenie korelacji z parametrami produktów. Pan mgr Bienias wykazał się znajomością różnorodnych technik analitycznych na podstawie, których potrafił opracować wyniki i wyciągnąć wnioski.

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska Pana mgr Rafała Bielasa zawiera elementy nowości naukowej, co zostało również udokumentowane artykułami opublikowanymi w czasopismach o zasięgu międzynarodowym znajdujących się na liście filadelfijskiej. Stanowi ona ważny wkład w rozwój badań nad opracowaniem nowych polimerowych nośników leków o właściwościach polielektrolitów oraz ich oddziaływań ze związkami charakteryzującymi się aktywnością biologiczną. Na podkreślenie zasługuje złożoność przeprowadzonych w rozprawie badań. Zamieszczone uwagi stylistyczne nie mają wpływu na bardzo dobrą ocenę merytoryczną badań przedstawionych w pracy. A przedstawione komentarze w wynikają bardziej z zainteresowania wynikami opisanymi w pracy niż błędami merytorycznymi.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca Pana mgr Rafała Bielasa spełnia wymagania „Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym...” z dnia 18 marca 2011 r i zwracam się do Rady Wydziału Chemii Politechniki Śląskiej o dopuszczenie mgr Rafała Bielasa do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę do Rady Wydziału Chemii o wyróżnienie rozprawy.